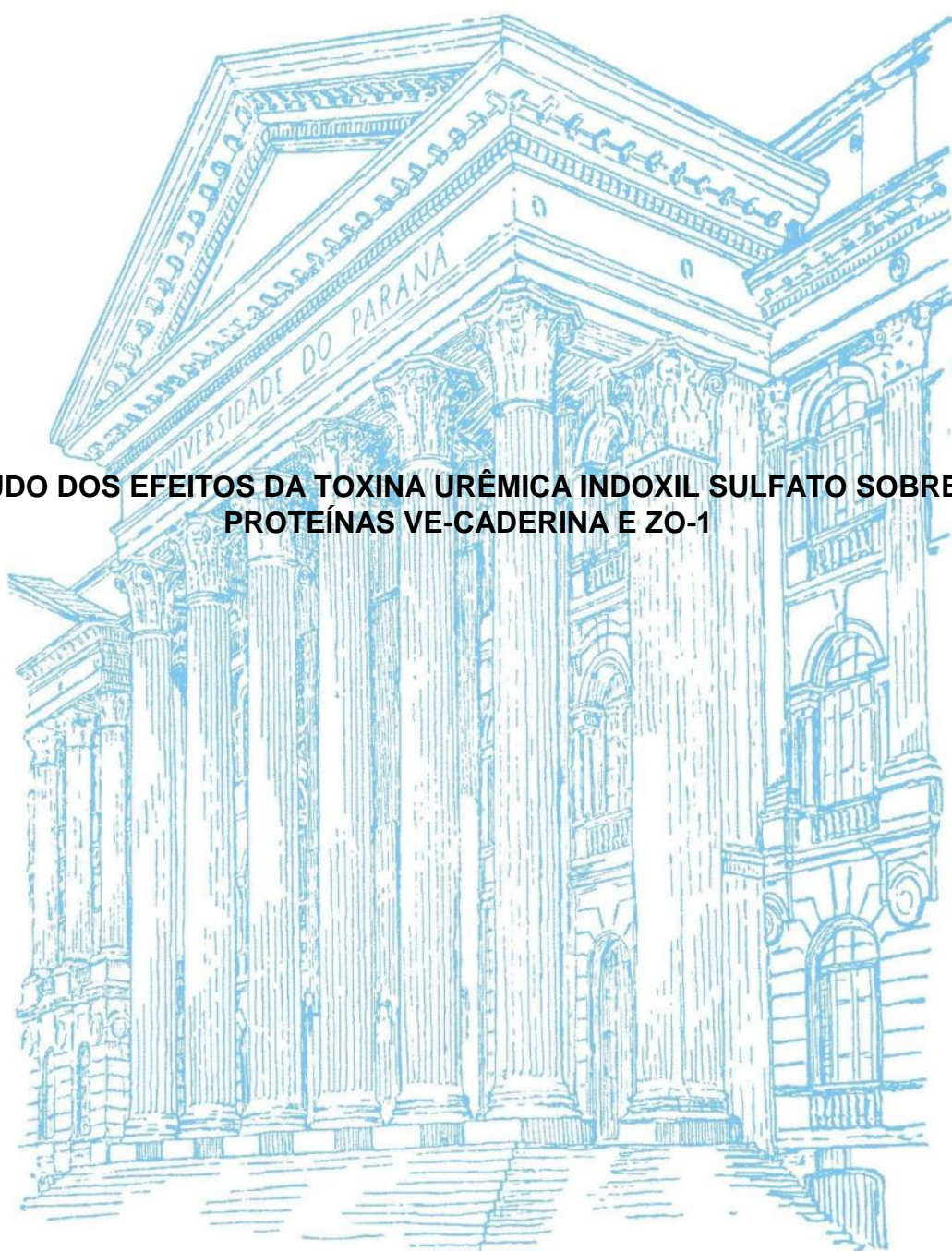


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

VALENTINA BUSATO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO SOBRE AS
PROTEÍNAS VE-CADERINA E ZO-1**



CURITIBA

2017

VALENTINA BUSATO

**ESTUDO DOS EFEITOS DA TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO SOBRE AS
PROTEÍNAS VE-CADERINA E ZO-1**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dra Andréa Emilia Marques Stinghen

Coorientadora: Doutoranda Rayana Ariane Pereira Maciel

CURITIBA

2017

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por ter permitido que eu vivenciasse essa experiência maravilhosa que foi cursar a Biomedicina na UFPR e concluir essa etapa com a realização de um trabalho que tanto gosto!

À minha família, em especial, meus pais, irmãos e avó pela paciência, amor, união e compreensão, fatores esses que foram essenciais para a realização dessa etapa. Vocês são tudo para mim e sem vocês, nada disso seria possível.

Não poderia deixar de agradecer à minha mãe, por ter dedicado seu tempo para me auxiliar nas correções com o maior empenho e dedicação. Te amo, mãe!

À minha orientadora, professora Andréa e minha coorientadora, Rayana, pela oportunidade de fazer parte de uma equipe que eu admiro muito, por terem me orientado da melhor forma em todo o meu trajeto e, principalmente, por terem me concedido a oportunidade de participar de um projeto pelo qual eu tenho tanto carinho.

Agradeço aos meus colegas de classe, pelas risadas, ajuda nos momentos de desespero e por toda a união acima de todo e qualquer desafio durante esses 4 anos.

Agradeço a todos os colegas do LabNefo: Regiane, Ray, Giane, Paulo e Bruna por todos os momentos de descontração e ainda, por sempre estarem à disposição para me auxiliar quando as dúvidas surgiam e durante as metodologias. Vocês são uma equipe e tanto!

À professora Célia, por dedicar seu tempo com a maior boa vontade e ter se empenhado tanto em me ajudar nas metodologias.

À minha melhor amiga e meu namorado, por sempre acreditaram em mim e me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos.

Muito obrigada!

RESUMO

A disfunção endotelial é um evento frequente nos pacientes com doença renal crônica (DRC). Uma das funções da camada endotelial é atuar como barreira seletiva na permeabilidade vascular entre o sangue, a linfa e os tecidos, controlando a passagem de solutos e eletrólitos. Distúrbios nessa barreira podem ocorrer na presença de compostos urêmicos tóxicos e resultar em modificações em proteínas de junções intercelulares responsáveis pela adesão célula a célula. Esses eventos, por sua vez, contribuem para alterações na permeabilidade e desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCV). Portanto, a proposta do presente projeto é, por meio de estudos *in vitro*, investigar o efeito da toxina urêmica Indoxil Sulfato (IS) sobre as proteínas de junção celular VE caderina e zônula de oclusão 1 (ZO-1). Como modelo experimental, células endoteliais humanas imortalizadas (EA.hy926) foram tratadas com a toxina IS na concentração máxima urêmica (236 mg/L) preconizada pelo *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox). A viabilidade celular após o tratamento foi avaliada por meio do ensaio de MTT e análises de alterações estruturais celulares foram avaliadas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os efeitos tóxicos do IS sobre a expressão gênica das proteínas VE-caderina e ZO-1 foram avaliados por meio de reação em cadeia de polimerase por transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR) e a localização e expressão endógena dos alvos foi avaliada por ensaio de Imunofluorescência. Nossos resultados indicam que o IS reduz significativamente a viabilidade celular após 24 e 48 horas e é capaz de induzir alterações no padrão morfológico e estrutural das células endoteliais. O tratamento com IS também acarretou redução na expressão da VE-caderina e aumento na expressão de ZO-1. O ensaio de imunofluorescência, por sua vez, indicou alteração no padrão de marcação de VE-caderina na extensão da membrana celular e uma expressiva redução na marcação de ZO-1 na presença do IS. O presente estudo demonstra portanto, alterações estruturais em células endoteliais após tratamento com IS, além disso o IS foi capaz de alterar a expressão de proteínas importantes das junções intercelulares e, conseqüentemente, a integridade da barreira endotelial. Esperamos que nossos resultados possam auxiliar na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na uremia e levar a descoberta de novas estratégias terapêuticas para pacientes com DRC.

Palavras-chave: Doença renal crônica, disfunção endotelial, VE-caderina, ZO-1

ABSTRACT

Endothelial dysfunction is a frequent event on patients with Chronic Kidney Disease (CKD). The endothelium has many functions over and above its well-recognized role in acting as a barrier between the blood, lymph and tissues, regulating the transport of solutes and electrolytes. Changes in this barrier occur during stimulation by uremic toxins and may result in modifications in intercellular junction proteins responsible for cell-to-cell contacts. These events contribute to modify vascular permeability and consequently, development of cardiovascular disease (CVD). Therefore, the aim of the present study is to investigate the effects of the uremic toxin IS *in vitro* on two cell-cell junction proteins, VE-cadherin and ZO-1. For that, human endothelial immortal cells were treated with IS at the maximum uremic concentration (236 mg/L) which was preconized by the *European Uremic Toxin Work Group* (EUTox). The cell viability was measured by MTT assay and structural changes were investigated by scanning confocal electron microscopy. The deleterious effects of IS on VE-cadherin and ZO-1 gene expression were evaluated by RT-qPCR assay and their localization and endogenous expression levels were analyzed by Immunofluorescence microscopy. Our results show that IS reduced significantly cell viability after 24 and 48 h, besides IS is capable of inducing changes on endothelial cell morphology and structure. The treatment also resulted in decreased expression of VE-cadherin and increase in ZO-1 gene expression. The Immunofluorescence microscopy assay showed an altered pattern of VE-cadherin distribution on the cell membrane and an expressive decrease in ZO-1 in most cells in the presence of IS. The present study demonstrates the structural changes on endothelial cells in the presence of IS, and indicates that this toxin is capable of altering the expression of proteins that are important for maintaining the cell-to-cell junctions and, consequently, the endothelial barrier integrity. We expect that our results can help to understand the underlying mechanisms involved in uremia and lead to the development of therapeutic strategies for CKD patients.

Keywords: Chronic Kidney Disease, vascular permeability, VE-cadherin, ZO-1

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTADIAMENTO DA DRC.....	11
TABELA 2 – EXIGÊNCIAS PARA UM DADO COMPOSTO SER CONSIDERADO TOXINA URÊMICA.....	13
TABELA 3 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DOS GENES <i>VE-CADERINA</i> , <i>ZO-1</i> E <i>HPRT</i>	23

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – MORTALIDADE BRUTA DE PACIENTES EM DIÁLISE (2011-2014).....	11
--	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FORMAÇÃO DO IS.....	14
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA <i>VE-CADERINA</i> E SUAS INTERAÇÕES.....	16
FIGURA 3 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>B-CATENINA</i> E <i>FOXO1</i> PELA <i>VE-CADERINA</i> SOBRE CONDIÇÕES NÃO PATOLÓGICAS.....	17
FIGURA 4 – DOMÍNIOS DE FOSFORILAÇÃO DA <i>VE-CADERINA</i>	18
FIGURA 5 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FOSFORILAÇÃO DA <i>VE-CADERINA</i>	18
FIGURA 6 – ESTRUTURA DA <i>ZO-1</i>	20
FIGURA 7 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FOSFORILAÇÃO DE <i>ZO-1</i>	21
FIGURA 8 – MTT IS 24 e 48 HORAS.....	27
FIGURA 9 – qPCR <i>VE-CADERINA</i>	28
FIGURA 10– qPCR <i>ZO-1</i>	29
FIGURA 11 – ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS EM MEV.....	31
FIGURA 12 – ANÁLISE DA MARCAÇÃO DE <i>VE-CADERINA</i> EM CÉLULAS CONTROLE E EXPOSTAS AO IS.....	33
FIGURA 13 – ANÁLISE DE MARCAÇÃO DE <i>ZO-1</i> EM CÉLULAS CONTROLES E EXPOSTAS AO IS.....	35

SUMARIO

1	INTRODUÇÃO	8
1.1	OBJETIVOS	9
1.1.1	Objetivo Geral	9
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
1.3	JUSTIFICATIVA	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1	DOENÇA RENAL CRÔNICA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES	10
2.2	TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO	13
2.3	PERMEABILIDADE VASCULAR NO CONTEXTO DA UREMIA	15
2.4	PROTEÍNA VE-CADERINA	15
2.5	PROTEÍNA ZO-1	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	CULTIVO CELULAR	22
3.2	TRATAMENTO DAS CÉLULAS	22
3.3	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR	22
3.4	REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE POR TRANSCRIPTASE REVERSA QUANTITATIVA (RT-QPCR)	24
3.5	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	24
3.6	ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM LASER CONFOCAL	24
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4.	RESULTADOS	26
4.1	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR- MTT	26
4.2	REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE POR TRANSCRIPTASE REVERSA QUANTITATIVA (RT-QPCR)	28
4.2.1	Análise da marcação de VE-Caderina	28
4.2.2	Análise da marcação de ZO-1	29
4.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRONICA DE VARREDURA	30

4.4	ANÁLISE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM LASER CONFOCAL.....	33
4.4.1	Análise da marcação de VE-Caderina.....	33
4.4.2	Análise da expressão de ZO-1.....	35
5	DISCUSSÃO.....	36
6	CONCLUSÃO.....	39
7	PERSPECTIVAS FUTURAS.....	40
	REFERÊNCIAS.....	41

1. INTRODUÇÃO

Dados do último censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) indicam que em Julho de 2016, 122.825 pacientes encontravam-se em diálise, o que indica um crescimento anual de 6.3% no número de pacientes acometidos por problemas renais crônicos e em tratamento (SESSO et al., 2017). Conforme a progressão da DRC, os rins perdem a capacidade de excretar substâncias tóxicas do organismo, que se mantém na circulação sanguínea, causando efeitos deletérios em diversos órgãos e sistemas, dentre eles o sistema cardiovascular.

O IS é uma toxina urêmica de baixo peso molecular derivada do metabolismo do triptofano obtido a partir da alimentação. O IS contribui para a progressão da DRC, inibindo a proliferação celular, estimulando a formação de radicais livres em células tubulares renais (PENG et al., 2012) e pode estar envolvido no processo de aterosclerose (NIWA, 2010). Estudos recentes *in vitro* também demonstraram que o tratamento de células endoteliais pulmonares com IS resulta na ruptura e alteração na expressão de junções intercelulares (PENG et al., 2012). Sabe-se que alterações nas proteínas de junção celular estão relacionadas com um aumento na permeabilidade vascular, por meio da formação de lacunas entre as células adjacentes, o que pode resultar em comorbidades cardiovasculares.

O endotélio vascular tem sua integridade e permeabilidade reguladas por diversos fatores, dentre eles complexos proteicos envolvidos com a adesão celular, como as *tight junctions* (TJs) /junções de oclusão, *adherens junctions* (AJs)/junções aderentes e *gap junctions*/ junções do tipo gap. A VE-caderina, componente transmembrana das AJs exclusivo do endotélio vascular é uma caderina do tipo II e exerce grande atividade adesiva. Estudos mostram que essa proteína é responsável pela integridade vascular, de maneira que seu silenciamento *in vitro* resulta na insuficiência e aumento da apoptose do endotélio (CARMELIET et al., 1999). As TJs, por sua vez, são os componentes mais apicais do complexo juncional intercelular e são compostas por grupos de proteínas como ocludinas, claudinas e proteínas de associação como a ZO-1. Esse grupo de proteínas é responsável por mediar a adesão e comunicação entre células adjacentes assim como regulação da permeabilidade paracelular (BAZZONI, 2004). A zônula de oclusão ZO-1 é um componente intercelular de associação às TJs que interage com outras proteínas e com o

citoesqueleto de actina, processo essencial para a integridade da barreira endotelial (HARHAJ; ANTONETTI, 2004). Estudos recentes também indicam que a diminuição na expressão da ZO-1 na barreira do epitélio alveolar está diretamente relacionada com aumento na permeabilidade, resultando em edema (YANG et al., 2017).

Considerando que o IS apresenta uma toxicidade expressiva no contexto da uremia e que pacientes DRC apresentam alterações no endotélio vascular, o presente projeto visou avaliar os efeitos dessa toxina urêmica sobre a permeabilidade vascular, mais especificamente sobre as proteínas de junção celular VE-caderina e ZO-1. Esperamos que nossos resultados possam auxiliar na compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na uremia e levar a descoberta de novas estratégias terapêuticas para pacientes com DRC.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Analisar os efeitos da toxina IS sobre as proteínas de junção celular VE-caderina e ZO-1.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a viabilidade das células endoteliais humanas através do ensaio de MTT, após tratamento com IS;
- Avaliar por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a morfologia celular após tratamento com IS;
- Avaliar a expressão dos genes envolvidos na transcrição de VE-caderina e ZO-1 por meio de RT-qPCR, após tratamento com IS;
- Avaliar a expressão das proteínas de junção celular VE-caderina e ZO-1 por imunofluorescência, após tratamento com IS;

1.3 JUSTIFICATIVA

A doença renal crônica constitui hoje um problema médico e de saúde pública. O número de pacientes acometidos pela doença é alto e apresenta-se crescente, o que pode ser evidenciado no censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) de Julho de 2016, que indica um aumento nos últimos 5 anos no número de pacientes que encontram-se em diálise (SESSO et al., 2016). A DRC envolve o acúmulo de compostos urêmicos que normalmente seriam excretados pelos rins, e isso gera, a longo prazo, uma série de efeitos deletérios em diferentes tecidos sendo um deles o endotélio vascular. Sabe-se que alterações na permeabilidade ocorrem em decorrência de mudanças em proteínas responsáveis pela adesão celular, dentre elas as *tight junctions*, *adherens junctions* e *gap junctions*. Dados prévios de nosso grupo, juntamente com outros estudos, correlacionam alterações na permeabilidade endotelial com a uremia, entretanto, ainda não está bem descrito a relação do ambiente urêmico com alterações em proteínas de junções celulares. Assim, esperamos que o nosso trabalho possa elucidar os efeitos que o IS pode apresentar sobre duas proteínas de junções celulares envolvidas com a adesão célula-a-célula presentes no endotélio vascular (VE-caderina e ZO-1), na tentativa de compreender a relação dessa toxina com alterações na permeabilidade endotelial. A compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na toxicidade urêmica relacionada a DRC pode levar a médio e longo prazo, a descoberta de novas estratégias terapêuticas e, por conseguinte, melhora na sobrevida do paciente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DOENÇA RENAL CRÔNICA E DOENÇAS CARDIOVASCULARES

A Doença Renal Crônica (DRC) é definida como presença de lesão renal por período igual ou superior a 3 meses, apresentando anormalidades estruturais ou funcionais dos rins, com ou sem diminuição da taxa de filtração glomerular (TFG). Quanto maior o estadiamento da DRC, menor a TFG (tabela 1). A insuficiência renal, que ocorre no estágio mais avançado da doença é estabelecida quando a TFG atinge

valores inferiores a 15 mL/min/1,73 m² (INKER et al., 2014). De acordo com o Censo da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) de 2013, estima-se que no Brasil existem mais de 2 milhões de brasileiros portadores de algum grau de disfunção renal, bem como um grande aumento no percentual de pacientes que iniciam a diálise. Estudos conduzidos por (SESSO et al., 2017) indicam que o número estimado de pacientes em diálise no país em 2016 foi de 122.825, representando um aumento de aproximadamente 30.500 pacientes nos últimos cinco anos. As taxas de mortalidade dentre esses pacientes são altas e estudos conduzidos por (SESSO et al., 2016) mostraram que em 2014 o número de pacientes em diálise que vieram a óbito chegou a uma estimativa de 21.281 casos, correspondendo a uma taxa de mortalidade bruta de 19% durante o ano (gráfico 1).

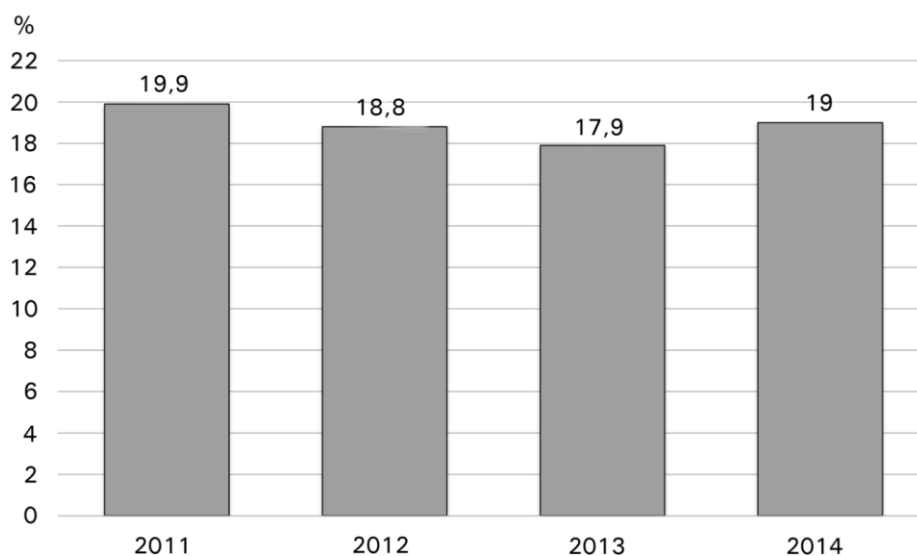
TABELA 1: ESTADIAMENTO DA DRC

Grupos	Função renal	TFG (ml/min/1.73 m2)
G1	Normal	≥90
G2	Redução leve	60–89
G3a	Redução leve- moderada	45–59
G3b	Redução moderada- severa	30–44
G4	Redução severa	15–29
G5	Falha da função renal	<15

NOTA: Os pacientes DRC são classificados em 6 diferentes grupos de acordo com a redução progressiva da função renal.

Fonte: Adaptado de (MOE; DRUEKE; GROUP, 2017)

GRÁFICO 1 – MORTALIDADE BRUTA DE PACIENTES EM DIÁLISE (2011-2014)



FONTE: (SESSO et al., 2016)

Com a progressão da DRC, observa-se um quadro de uremia que consiste na retenção progressiva de compostos orgânicos denominados toxinas urêmicas no sangue, acarretando efeitos deletérios como processos inflamatórios em diferentes tecidos, dentre eles, no endotélio vascular. A agressão constante do endotélio a partir da interação entre toxinas e células endoteliais, com alteração do fenótipo celular, pode refletir, ao menos em parte, os níveis plasmáticos elevados de marcadores de inflamação vascular. Na DRC, vários marcadores de risco cardiovascular têm sido amplamente estudados, tais como as citocinas *interleukin 8* (IL-8) e *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) e as moléculas de adesão *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1) e *intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) (SULIMAN et al., 2006). Estudos clínicos demonstraram que os níveis séricos desses marcadores estão aumentados em estágios mais avançados da DRC. Isso pode ser explicado, em parte, pela exposição das células endoteliais ao soro urêmico. Estudos *in vitro* demonstraram que essa exposição resulta em expressões aumentadas de MCP-1, IL-8 e VCAM-1s, o que sugere uma ligação entre a ativação vascular, a inflamação sistêmica e a toxicidade urêmica (MACIEL et al., 2016; STINGHEN et al., 2009).

Sabe-se que a principal causa de morte nos pacientes com DRC são as doenças cardiovasculares (DCV) (EL NAHAS, 2010), que podem levar a aterosclerose e ao acidente vascular cerebral (LUSIS, 2000). Com aproximadamente 50% de todas as mortes (VANHOLDER et al., 2005), o infarto é a terceira maior causa de morte cardiovascular em pacientes com DRC, sendo 5 a 10 vezes mais prevalente do que

na população em geral. De acordo com o *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO), um terço desses infartos ocorre durante ou logo após a sessão de hemodiálise, dados estes provindos do estudo *Choices for Healthy Outcomes in Caring* (CHOICE), envolvendo 1041 pacientes em estágio 5 de DRC (74% em hemodiálise) (HERZOG et al., 2011). A relação inversa entre o desenvolvimento de DCV e a TFG pode envolver tanto fatores de risco cardiovasculares tradicionais (hipertensão, diabetes mellitus e dislipidemia) como fatores específicos da DRC (anemia, proteinúria, stress oxidativo e inflamação). Estudos indicam que a redução da função renal possui grande valor preditivo para morte cardiovascular, principalmente pra pacientes sem histórico de DCR (DEO et al., 2008).

2.2 TOXINA URÊMICA INDOXIL SULFATO

As toxinas urêmicas ou solutos de retenção urêmica, são resíduos orgânicos normalmente excretados pelos rins, porém, se acumulam no organismo com a progressão da DRC. Esses compostos tiveram suas características mais elucidadas após a criação do Grupo de Trabalho Europeu de Toxinas Urêmicas (EUTox), em 1999. De acordo com o grupo, um composto pode ser considerado urêmico quando compatível com um postulado por (VANHOLDER et al., 2003a), evidenciado na tabela 2.

TABELA – 2

EXIGÊNCIAS PARA UM DADO COMPOSTO SER CONSIDERADO TOXINA URÊMICA
Quimicamente identificado e medido de forma precisa;
Níveis plasmáticos/corporais totais deverão ser mais altos do que em indivíduos não-urêmicos;
Altas concentrações deverão estar correlacionadas a disfunções/sintomas específicos, que desaparecem à medida que as concentrações são reduzidas;
A atividade biológica desse composto deve ser comprovada em estudos <i>ex vivo</i> , <i>in vivo</i> ou <i>in vitro</i> , e finalmente, concentrações experimentais dessa molécula nesses estudos devem ser compatíveis com aquelas encontradas nos fluidos corporais ou tecidos de pacientes urêmicos.

FONTE: (BARRETO et al., 2014)

Atualmente já foram identificados mais de 100 compostos urêmicos, que são classificados (VANHOLDER et al., 2003a) de acordo com suas propriedades físico-químicas e características de remoção por diálise em:

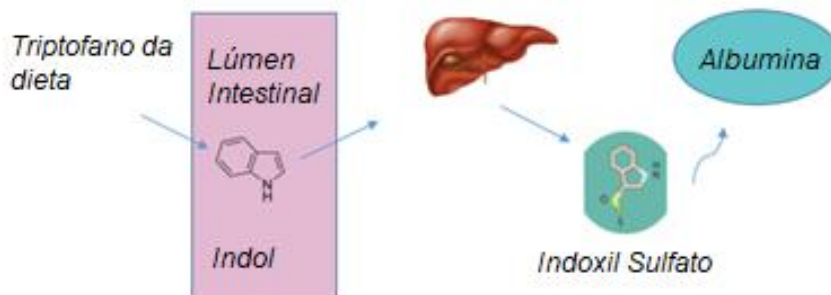
- Compostos pequenos solúveis em água com no máximo 500 Da, que têm como protótipos moléculas como ureia e creatinina e que são facilmente removidos por diálise. Os compostos neste grupo não têm necessariamente uma toxicidade funcional;

- Compostos de peso molecular moderado com mais de 500 Da. Os protótipos deste grupo são β 2-microglobulina e leptina. Essas moléculas só podem ser removidas por membranas de porosidade grande o suficiente para permitir sua passagem através da membrana. Muitos dos compostos deste grupo são peptídeos que afetam um grande número de órgãos e sistemas;

- Compostos ligados a proteínas, em geral com baixo peso molecular. Os protótipos deste grupo são os fenóis, como o *p*-cresol e o *p*-cresil sulfato e os indóis, como o indoxil sulfato.

A toxina urêmica IS ($C_8H_7NO_4S$) é um indol com peso molecular de 213,21 Da e é gerada a partir do metabolismo do triptofano. O triptofano obtido em dietas proteicas é convertido por bactérias intestinais em indol e posteriormente metabolizado em indoxil sulfato no fígado e circula em sua forma livre e ligado a albumina (figura 1). Essa toxina é eliminada via secreção do túbulo proximal, entretanto, é acumulada no sangue de pacientes DRC. Por ter forte afinidade com albumina sérica, o IS não é eficientemente removido com diálise (NIWA, 2010).

FIGURA 1: FORMAÇÃO DO IS



FONTE: Adaptado de (MEIJERS et al., 2011)

O indoxil sulfato em concentrações urêmicas induz o estresse oxidativo celular. Estudos *in vitro* com células tubulares proximais demonstraram que o IS aumenta a produção de Espécies reativas de oxigênio (ROS) e ativa os fatores de transcrição NF-κB e p53 (SHIMIZU et al., 2013). O estresse oxidativo e o efeito antiproliferativo causados pelo IS podem ser atribuídos a disfunção mitocondrial, podendo ser tratados com antioxidantes (LEE et al., 2015). Sabe-se que essa toxina está relacionada com alterações na permeabilidade, sendo que estudos mostraram que após tratamento com IS a permeabilidade de células endoteliais pulmonares bovinas aumentou em 17% por meio do remodelamento do citoesqueleto e contração celular, que romperam as junções intercelulares (PENG et al., 2012).

2.3 PERMEABILIDADE VASCULAR NO CONTEXTO DA UREMIA

Na uremia, alterações estruturais do sistema cardiovascular são consequências dos distúrbios metabólicos, alterações de pressão e/ou sobrecarga do fluxo sanguíneo. O endotélio vascular possui várias funções, como antiinflamatória, anticoagulante e vasodilatadora assim como a de atuar como uma barreira seletiva e semi-permeável, impedindo o extravasamento de líquido. É responsável por manter a homeostase, atuando ativamente nas propriedades geométricas e estruturais de artérias de grande calibre. O termo disfunção endotelial tem sido usado para se referir

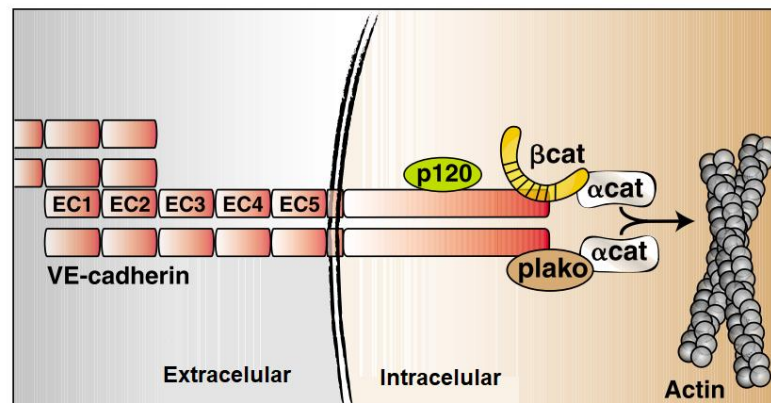
a várias condições patológicas, incluindo alterações anticoagulantes e propriedades anti-inflamatórias do endotélio, deficiência na modulação do crescimento vascular e desregulação no remodelamento vascular (CAI; HARRISON, 2000). O endotélio vascular pode ter sua integridade alterada em patologias como edema pulmonar, nefropatias, tumores e artrite reumatóide por conta, também, de alterações nos níveis de fatores de crescimento como VEGF, por exemplo (HARHAJ; ANTONETTI, 2004). Essas alterações endoteliais já foram estudadas no contexto da uremia, de maneira que estudos *in vivo* mostram que o plasma urêmico, rico em compostos tóxicos, induz aumento na permeabilidade vascular e esse mecanismo patogênico pode ser muito importante no desenvolvimento de doenças vasculares (HARPER; TOMSON; BATES, 2002). Dentre as proteínas relevantes para a formação de junções intercelulares, estão as proteínas VE-caderina e junção de oclusão ZO-1 que podem, portanto, estar relacionadas com alterações na permeabilidade vascular.

2.4 PROTEÍNA VE-CADERINA

As caderinas pertencem ao grupo das *adherens junctions* (AJs). São glicoproteínas transmembrana que se ligam a componentes citoplasmáticos formando complexos de adesão celular, sendo a VE-caderina responsável por esse processo no endotélio (VESTWEBER, 2008). Essa proteína, conhecida como caderina 5 ou CD144, possui 120 KDa aproximadamente e é responsável por mediar interações célula-a-célula dependentes da presença de cálcio em resíduos aminoacídicos negativos de seu domínio extracelular (DEJANA; ORSENIGO; LAMPUGNANI, 2008). A VE-caderina se liga ao citoesqueleto de actina por intermédio de proteínas da família das cateninas (α -, β -, γ -, e p120-catenina). Modelos recentes indicam que a VE-caderina se liga diretamente a β - e γ - cateninas e essas últimas se conectam com a actina por intermédio da α -catenina (BROMAN et al., 2006). A conexão ao citoesqueleto também é estabilizada por meio da p120, que forma complexos com proteínas quinases e fosfatases trazendo essas para próximo da caderina (YUAN & RIGOR, 2010). Essas conexões da proteína estão ilustradas na Figura 2. As *adherens junctions* também exercem influência sobre a expressão das *tight junctions*. Estudos previamente realizados demonstraram que a VE-caderina regula a fosforilação de fatores de transcrição como o FoxO1 e β -catenina, impedindo seu acúmulo (figura 3). No caso de perda de função da VE-caderina, há um aumento na atividade de FoxO1

e β –catenina, resultando na inibição do promotor da claudina-5 e uma consequente redução de interações proteicas relevantes para a integridade do endotélio vascular (TADDEI et al., 2008).

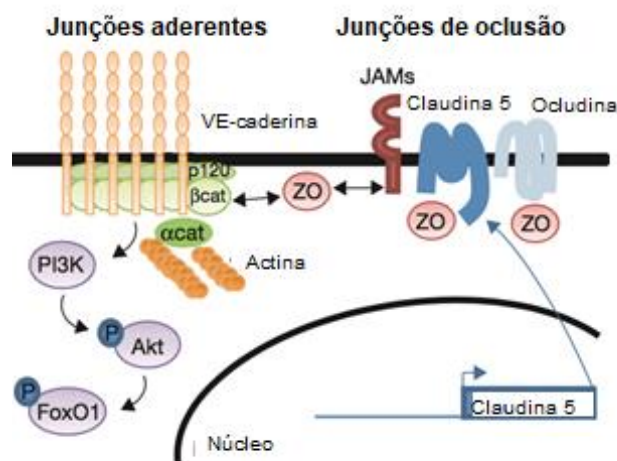
FIGURA 2 – REPRESENTAÇÃO DA VE-CADERINA E SUAS INTERAÇÕES



FONTE: Adaptado de: (DEJANA; ORSENIGO; LAMPUGNANI, 2008)

NOTA: A VE-caderina possui cinco domínios homólogos extracelulares e em seu domínio intracelular estabelece contato com as proteínas p120, β –catenina (β –cat), placoglobina (plako). As duas últimas se associam diretamente a α -catenina, permitindo a interação com o esqueleto de actina.

FIGURA 3 – REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE B-CATENINA E FOXO1 PELA VE-CADERINA SOBRE CONDIÇÕES NÃO PATOLÓGICAS

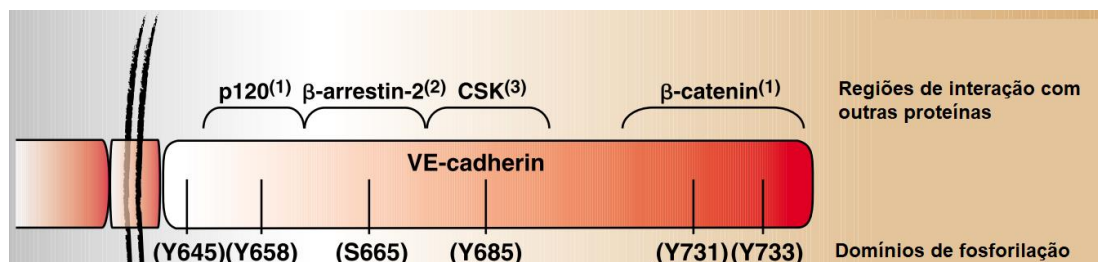


FONTE: (GAVARD; GUTKIND, 2008)

NOTA: Endotélio vascular sobre condições fisiológicas normais, composto por complexos proteicos de adesão intercelular. A presença da VE-caderina regula a expressão dos fatores de transcrição FoxO1 e Bcat, permitindo que a claudina 5 seja transcrita e, posteriormente, forme interações com a ZO-1, resultando na manutenção das interações célula-a-célula.

A VE-caderina é regulada por diferentes mecanismos, em nível de transcrição e por modificações pós-traducionais. A fosforilação é bem citada na literatura e já se tem descrito que uma redução na fosforilação da VE-caderina por fosfatases torna a barreira endotelial mais íntegra (NAWROTH et al., 2002) . Os domínios passíveis de fosforilação da proteína estão ilustrados na figura 4. Estudos *in vivo* mostram que essa proteína é fosforilada em resíduos de tirosina de maneira dependente de Src quinases (LAMBENG et al., 2005). Sabe-se que o VEGF (*vascular endothelial growth fator*), importante nos processos de angiogênese, gera a fosforilação e endocitose da VE-caderina (GAVARD; GUTKIND, 2006) (figura 5) e a inibição farmacológica do VEGF ou da Src resulta em estabilidade funcional da barreira endotelial (WEIS et al., 2004). Alterações em nível molecular foram evidenciadas em situações de angiogênese, em que o promotor da VE-caderina é ativado (PRANDINI et al., 2005) e já se tem descrita a importância de alguns fatores de transcrição como o Krüppel-Like Factor-4 (KLF4) para a regulação da expressão da VE-caderina e sua relevância na manutenção da integridade endotelial vascular (GANGARAJU VAMSI K. LIN HAIFAN, 2009).

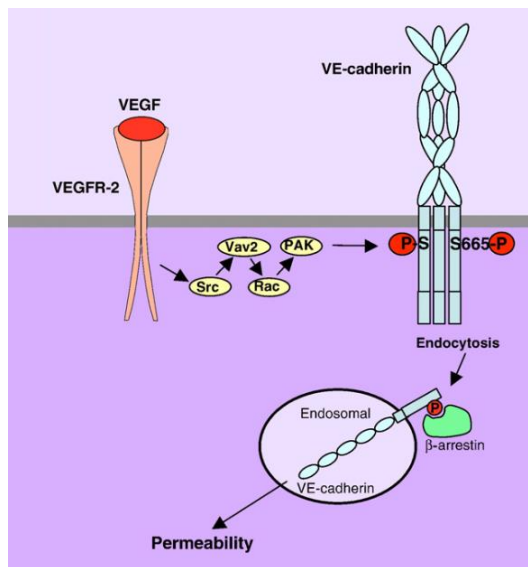
FIGURA 4 – DOMÍNIOS DE FOSFORILAÇÃO DA VE-CADERINA



FONTE: Adaptado de: (DEJANA; ORSENIGO; LAMPUGNANI, 2008)

NOTA: A VE-caderina possui sítios tirosina (Y) e serina (S) de fosforilação e estabelece ligações com diferentes proteínas. Essas interações podem ser reguladas positivamente (CSK, B-arrestin-2) ou negativamente (p120, B-catenina) pela fosforilação.

FIGURA 5 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FOSFORILAÇÃO DA VE-CADERINA



FONTE: (WALLEZ; HUBER, 2008)

NOTA: O VEGF ativa a cascata (Src→Vav2→Rac→PAK), o que resulta na fosforilação da VE-caderina no resíduo de serina 665. A proteína fosforilada torna-se um sítio de ligação a B-arrestin, o que marca a caderina para endocitose e degradação, resultando em ruptura nas junções celulares.

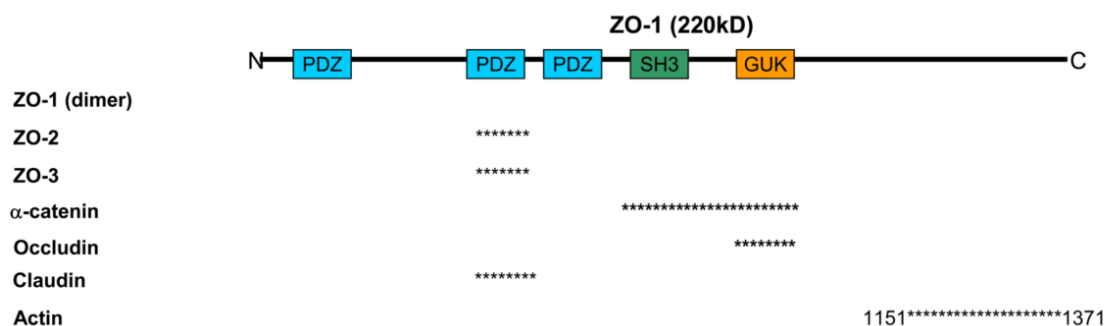
A proteína em questão é diretamente relacionada não apenas com a manutenção, mas também com a formação do endotélio. Estudos *in vitro* mostraram que a deleção do gene da VE-caderina em células embrionárias de rato resulta em células endoteliais dispersas e em uma formação severamente prejudicada do endotélio (VITTET et al., 1997). Estudos mais recentes *in vitro* e *in vivo* sugerem, ainda, a estabilização da VE-caderina no tratamento de hiperpermeabilidade vascular, evidenciando, portanto, a relevância da proteína na regulação da permeabilidade endotelial (HEUPEL et al., 2009).

2.5 PROTEÍNA ZO-1

As *Tight junctions* (TJs) são as junções apicais presentes no epitélio e endotélio, responsáveis por gerar uma barreira de difusão semi-permeável entre células individuais e selecionar a passagem de solutos (BALDA; MATTER, 1998). São compostas por claudinas, ocludinas e JAM, que formam complexos com outros componentes como α-catenina e zônulas de oclusão (ZO-1, ZO-2 e ZO-3). As TJs ocupam uma posição específica entre os domínios apicais e basolaterais e dependem de cálcio para estabelecerem suas ligações (CEREIJIDO; SHOSHANI; CONTRERAS, 2000). A zônula ocludente 1 (ZO-1) é o componente mais apical do complexo juncional celular e possui uma massa molecular de cerca de 220 KDa. Trata-

se de uma proteína transmembrana pertencente ao grupo das MAGUK (*membrane-associated guanylate kinases*) (GONZALEZ-MARISCAL et al., 2000), restrita às TJ epiteliais (ex.intestino) e endoteliais (ex. cérebro e artérias) (BAZZONI, 2004). Podem ser encontradas duas formas da ZO-1 resultantes de *splicing* alternativo, contendo um domínio α inserido na porção central da proteína, ZO-1 α + e ZO-1 α - (WILLOTT et al., 1992). A isoforma ZO-1 α - é encontrada apenas no endotélio vascular, e caracteriza junções mais dinâmicas. A ZO-1 consegue formar complexos heterodiméricos com outras TJs e com AJs, inclusive com caderinas e possui um C-terminal com domínios de *splicing* alternativo que possibilita a ligação a actina resultando na conexão das ZO ao citoesqueleto (HARHAJ; ANTONETTI, 2004). Essa proteína possui três domínios PDZ, um domínio SH3 e um domínio com homologia a guanilato ciclase (GuK) não catalítico (Woods & Bryant, 1993) (figura 6). A proteína em questão também parece exercer funções de sinalização. Estudos mostram que a ZO-1 se liga por meio de seu domínio SH3 ao fator de transcrição ZONAB (ZO-1-associated nucleic acid-binding protein) das *tight junctions*, controlando a expressão do promotor ErbB-2, sendo esse processo importante para a diferenciação celular (BALDA; MATTER, 2000). Uma redução na expressão da ZO-1 favorece a migração de ZONAB para o interior do núcleo, o que reduz a transcrição de ErbB-2 e acarreta diminuição da diferenciação de células epiteliais (RUAN et al., 2014).

FIGURA 6 – ESTRUTURA DA ZO-1

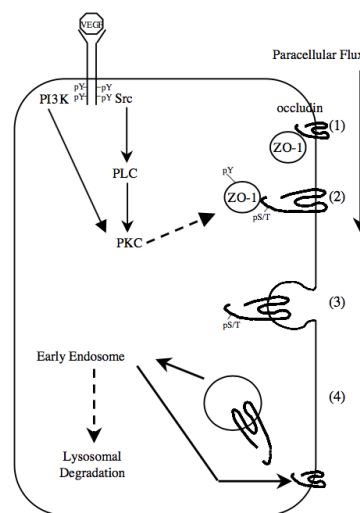


FONTE: (HARTSOCK; NELSON, 2008)

NOTA: Figura representando os domínios em que a ZO-1 é fosforilada e regiões de interação com outras proteínas (em asterisco). Os números representam os aminoácidos da região C terminal da proteína.

A ZO-1 é regulada por processos como a fosforilação e alterações em GTPases que regulam o citoesqueleto (HIRASE et al., 2001). De maneira similar ao que ocorre com a VE-caderina, o VEGF estimula a fosforilação de ZO-1 e de ocludinas, gerando a internalização do complexo e endocitose, o que resulta em aumento na permeabilidade paracelular (ANTONETTI et al., 1999) (figura 7). Estudos indicam que a ZO-1 se liga por meio de seu domínio SH3 a serina quinase, o que culmina na fosforilação da porção C- terminal por (BALDA; ANDERSON; MATTER, 1996). A ZO-1 também é fosforilada em seus resíduos de tirosina, resultando em alterações no endotélio vascular (Staddon, Herrenknecht, Smales, & Rubin, 1995; Takeda & Tsukita, 1995).

FIGURA 7- ESQUEMA ILUSTRATIVO DA FOSFORILAÇÃO DE ZO-1



FONTE: (HARHAJ; ANTONETTI, 2004).

NOTA: Modelo proposto de ruptura de *tight junctions* por estímulo do VEGF. O VEGF estimula a ativação da Src quinase e fosforilação de ocludinas e ZO-1. As ocludinas são então endocitadas e degradadas.

Estudos utilizando células epiteliais de camundongos na ausência do gene codificante da ZO-1 indicam que essa ausência não impossibilita, mas gera um retardo na formação das *TJs*, confirmando, portanto, que essa proteína forma complexos importantes para o funcionamento das junções intercelulares (UMEDA et al., 2004). No endotélio vascular de veias pulmonares, foi evidenciado que a *up-regulation* da osteopontina (OPN) gera um aumento na permeabilidade vascular por meio de redução na expressão das *TJs* claudina-5 e ZO-1 (ZHANG et al., 2017). Esse contexto também foi evidenciado no endotélio cerebral, de maneira que alterações na

expressão e distribuição de ZO-1, ocludinas e claudinas acarretaram modificações na permeabilidade vascular cerebral (CAI et al., 2015). Interessantemente, estudos recentes demonstram que a proteína em questão é um componente integral dos mecanismos regulatórios ativados pela VE-Caderina e essa regulação é responsável por mediar a reorganização do citoesqueleto de actina (TORNAVACA et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CULTIVO CELULAR

Como modelo experimental, foi utilizada linhagem de células endoteliais humanas imortalizadas (EA.hy926 ATCC 2922) cultivada em meio DMEM Dulbecco Modified Eagle Medium (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Sigma-Aldrich) e 10 mg/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco, Grand Island, EUA). As garrafas de cultivo foram mantidas na incubadora à 37°C com 5% de CO₂.

3.2 TRATAMENTO DAS CÉLULAS

As células foram mantidas em incubadora à 37°C com 5% de CO₂, até atingirem bastante confluência. Feito isso, o meio previamente utilizado foi removido e lavagens com PBS foram realizadas. O tratamento foi realizado na sequência, utilizando a toxina IS obtida comercialmente (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) na concentração preconizada pelo *European Uremic Toxin Work Group* (EuTox) como máxima urêmica (236 mg/L) (VANHOLDER et al., 2003). A cinética do tratamento foi de 24 e 48 horas para o ensaio de viabilidade celular e de 24 horas para os ensaios subsequentes.

3.3 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

Para este ensaio, foram plaqueadas 10⁴ células/poço em uma placa de 96 poços. As células foram mantidas em cultura com meio DMEM suplementado (10% SFB e 1% penicilina/estreptomicina) a 37°C e 5% de CO₂, até atingirem cerca de 90% de confluência. Após isso, foi realizada incubação com IS em cinética de tratamento de 24 e 48 horas. Após esse período, foi acrescentada uma solução de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich), deixando as células incubadas por mais 3 horas a 37°C e 5% CO₂ para a incorporação do MTT e consequente formação dos cristais de formazan. Posteriormente, todo o meio foi retirado e os cristais solubilizados em DMSO. A absorbância foi lida a 570 nm (MOSMANN, 1983). Os experimentos foram realizados em triplicatas.

3.4 REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE POR TRANSCRIPTASE REVERSA QUANTITATIVA (RT-QPCR)

Para analisar alterações na expressão gênica das proteínas VE-caderina e ZO-1, foi utilizada a técnica da RT-qPCR. Para tanto, o RNA total foi extraído das células lisadas por Trizol (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante e, posteriormente, precipitado com álcool isopropílico. A pureza e a concentração do RNA foram primeiramente verificadas pela razão da absorbância mensurada a 260 nm e 280 nm no espectrofotômetro Nano Drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA). A integridade do RNA foi analisada por eletroforese em gel de agarose, onde verifica-se a presença de duas bandas de RNA ribossomal. As moléculas de RNAm foram então convertidas em DNA complementar (cDNA), utilizando o high capacity RNA-to-DNA kit (Thermo Fisher Scientific), conforme orientações do fabricante. O cDNA foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores específicos utilizando o kit EvaGreen (ABM) no termociclador Rotor-Gene 6000 (Corbett). A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ Bustin et al. (2009) e Huggett et al. (2013). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvos e do gene normalizador *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase* (HPRT) estão descritos na TABELA 3 (CHENG; CHANG; LEUNG, 2013; STEWART et al., 2012).

TABELA 3 – SEQUÊNCIA DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES DOS GENES VE-CADERINA, ZO-1 E HPRT

Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Amplificação
VE-caderina	5'-CAGCCCAAAGTGTGTGAGAA-3' (F)	185 pb
	5'-CGGTCAAACCTGCCCATACTT-3' (R)	
ZO-1	5'-GCGGTCAGAGCCTTCTGATC -3' (F)	122 pb
	5'-CATGCTTTACAGGAGTTGAGACAG-3' (R)	
HPRT	5'-GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3' (F)	101 pb
	5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' (R)	

F: forward; R: reverse.

Fonte: Adaptado de (CHENG; CHANG; LEUNG, 2013; STEWART et al., 2012).

3.5 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para avaliação da morfologia das células após tratamento com a toxina IS, utilizamos a Microscopia Eletrônica de Varredura. Foram plaqueadas cerca de 10.000 células em lamínulas circulares (13 mm de diâmetro), em placas de 24 poços e mantidas em cultura por 24 horas. Após remoção do meio e lavagem com PBS, foi realizado o tratamento com a toxina por 24 horas, na concentração máxima urêmica. Como controle positivo, foi utilizado o composto tóxico DMSO (dimetilsulfóxido) e como controle negativo, células sem tratamento.

Após o tratamento, foram realizadas quatro lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 a 37°C. Para fixação, foi utilizada a solução de Karnovski (glutaraldeído 2%, paraformaldeído 4%, CaCl_2 1mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M) por 1 hora. Após isso, foram realizadas lavagens em tampão cacodilato de sódio 0,1M, (pH 7,2 a 7,4) a 37°C e fixação com tetróxido de ósmio 1% (diluído em tampão cacodilato de sódio 0,1M; pH 7,2 a 7,4) por 1 hora. Após a fixação, as células foram novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2 a 7,4) e desidratadas por concentrações crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), por um período de 10 minutos em cada concentração. Posteriormente, foi realizado ponto crítico no aparelho (CPD 010 (Critical Point Dryer) 030-Balzers) e metalização com ouro no aparelho (SCD 030-Balzers). Análises de alterações estruturais foram posteriormente realizadas no microscópio eletrônico de varredura (Tescan-Vega3-LMU-Scanning electron microscope) no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR). As imagens foram capturadas nos aumentos de 1,000X, 3,000X, 6,000X e 15,000X.

3.6 ENSAIO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM LASER CONFOCAL

Para marcação das proteínas VE-caderina e ZO-1 e posterior análise de alterações, foi realizada a técnica de Imunofluorescência. Foram plaqueadas 50.000 células sobre lamínulas circulares de 13 mm de diâmetro em uma placa de 24 poços. Em seguida essas células foram tratadas com IS concentração máxima urêmica na cinética de 24 horas. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram lavadas

2 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído (PFA) 2% por 20 minutos e mantidas a 4-8°C até posterior utilização. As células foram então bloqueadas com PBS + BSA 1% + saponina 0,01% por 1 hora a temperatura ambiente (19-23°C) e para bloqueio dos radicais aldeídicos foi utilizado PBS 1X contendo glicina 0,1% por 1 minuto. Posteriormente, as células foram incubadas com anticorpo *Mouse Anti-Human VE-Cadherin Monoclonal* (Catalog #MAB9381) (R&D Systems, Inc., Minnesota, USA) na concentração de 0,95 µg/mL em PBS + BSA 1% + saponina 0,01%. Para análise da ZO-1, foi utilizado *ZO-1 Polyclonal Antibody* (Catalog 40-2200) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) na concentração de 2.5 µg/mL em PBS + BSA 1% + saponina 0,01%. Os anticorpos foram mantidos por aproximadamente 24 horas. As lamínulas foram então bloqueadas com PBS + BSA 1% + saponina 0,01% por 1 hora, lavadas novamente com PBS por 2 vezes e procedeu-se a incubação com anticorpo *NorthernLights™ 557conjugated Anti-Mouse IgG Secondary* (vermelho; NL007) (R&D Systems, Inc., Minnesota, USA) diluído com PBS a 5 µg/mL ao abrigo da luz por 1 hora. Para a ZO-1, foi utilizado Donkey anti-Rabbit IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (A-21206) (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) diluído em PBS a 4 µg/mL também ao abrigo de luz. Posteriormente, utilizou-se PBS 1X para remover bem o resquício de anticorpo e as lamínulas foram lavadas em água destilada para montagem em lâminas histológicas. As lamínulas foram então montadas em 10 µL de Fluoromount G com DAPI (3 ng/mL-4',6-diamidino-2-fenilindole, dihidrocloride) (Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA), o que evidencia o núcleo das células em azul. Para finalizar, o material foi selado com esmalte incolor isento de formol e observadas no microscópio de fluorescência confocal Nikon A1RSiMP (Nikon Instruments, Tokyo, Japan).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para cálculo amostral foi realizado dos testes *t* de Student para os dados paramétricos e do teste de Mann-Whitney para dados não paramétricos. As diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. A análise foi realizada com auxílio do pacote estatístico GraphPad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, USA).

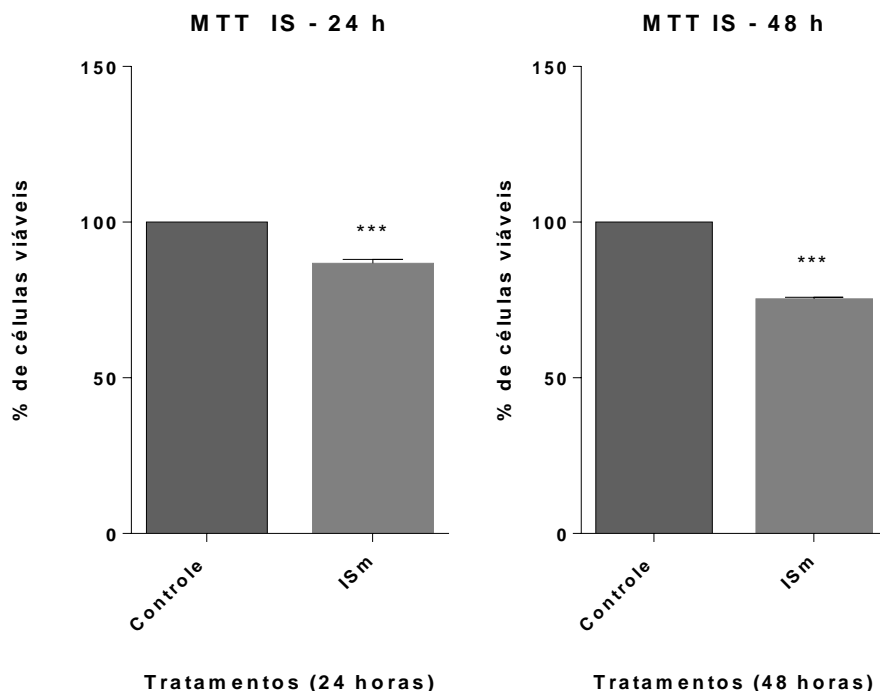
4. RESULTADOS

4.1 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR- MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio calorimétrico de MTT. Esse ensaio baseia-se no fato de que células viáveis conseguem converter o sal MTT em cristais de formazan por meio da enzima mitocondrial desidrogenase succínica. A figura 8 mostra que o tratamento por 24 h com IS na concentração máxima urêmica foi capaz de reduzir significativamente ($P<0.001$) a viabilidade celular quando comparado ao controle (células sem tratamento).

Após 48 horas, o IS na concentração máxima urêmica foi capaz de reduzir significativamente ($P<0.001$) a viabilidade das células de maneira expressiva, quando comparado ao controle (células sem tratamento). Essa grande redução na viabilidade poderia prejudicar a validade dos experimentos subsequentes, dessa forma, padronizamos a cinética de 24 horas para tratamento das células nos ensaios subsequentes.

FIGURA 8- MTT IS 24 e 48 HORAS



FONTE: O Autor (2017)

NOTA: As células foram tratadas com IS na concentração máxima urêmica por 24 e 48 h. Os experimentos foram feitos em triplicatas. O controle (células sem tratamento) foi considerado como células 100% viáveis. Os dados foram expressos como média \pm EPM *** $P < 0.001$.

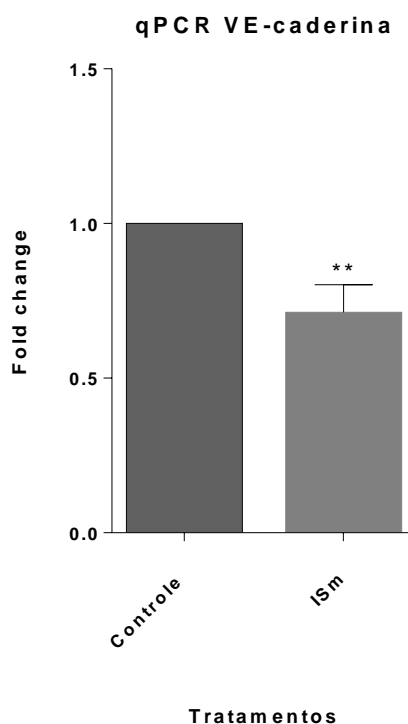
4.2 REAÇÃO DA CADEIA DE POLIMERASE POR TRANSCRIPTASE REVERSA QUANTITATIVA (RT-QPCR)

4.2.1 Análise da expressão de VE-Caderina

As células foram tratadas com IS por 24 h. Realizou-se extração do RNA das células pelo método de Trizol-Clorofórmio. O grau de pureza e a concentração do RNA foram quantificados pela razão da absorbância mensurada a 260 nm e 280 nm no espectrofotômetro e a integridade do material por meio de eletroforese em gel de agarose, no qual verificou-se a presença de duas bandas de RNA ribossomal. O RNA foi posteriormente convertido em DNA complementar (cDNA) e para amplificação, foi utilizado o kit EvaGreen (ABM). O gene *house-keeping* ou normalizador utilizado foi o HPRT. A expressão relativa dos genes foi analisada por meio do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ Bustin

et al. (2009) e Huggett et al. (2013). Essa metodologia utiliza a diferença entre a média do CT do gene de interesse e do normalizador (ΔCT). Assim, é feita uma comparação das médias do ΔCT do controle e do tratamento ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Nossos resultados indicam que o tratamento com o IS resultou em uma redução significativa da expressão da proteína VE-caderina nas células com relação ao controle (figura 9).

FIGURA 9- qPCR VE-CADERINA



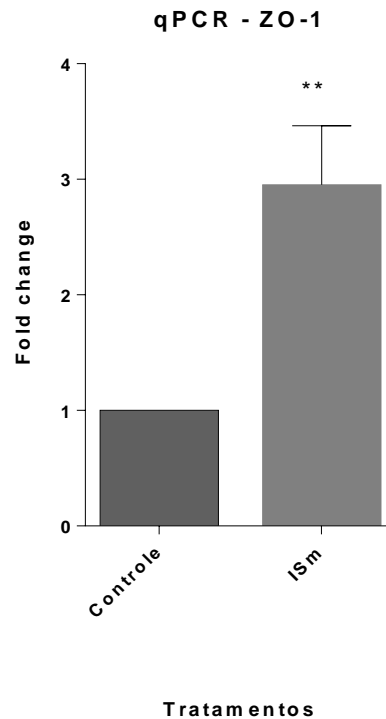
FONTE: O Autor (2017)

NOTA: As células foram tratadas por 24 h com a toxina na contração máxima urêmica. Fold change representa a variação de $2^{-\Delta\Delta CT}$ na expressão da VE-caderina em células controle (sem tratamento) e em células tratadas. Os experimentos foram realizados em quintuplicatas experimentais. Os dados foram expressos como média \pm EPM ** $P < 0,01$.

4.2.2 Análise da expressão de ZO-1

O tratamento com a toxina na concentração máxima urêmica por 24 h resultou em um aumento significativo na expressão da proteína ZO-1 quando comparada ao controle (figura 10).

FIGURA 10- qPCR ZO-1









FONTE: O Autor (2017)

NOTA: As células foram tratadas por 24 h com a toxina na contração máxima urêmica. Fold change representa a variação de $2^{-\Delta\Delta CT}$ na expressão da ZO-1 em células controle (sem tratamento) e em células tratadas. Os experimentos foram realizados em duplicatas e quintuplicatas experimentais. Os dados foram expressos como média \pm EPM ** $P < 0,01$.

4.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para avaliação de alterações estruturais nas células decorrentes da toxicidade do IS, foi realizada a análise em MEV. As células foram agrupadas como controle negativo (sem tratamento), controle positivo (tratadas com DMSO 4%) e tratadas com ISm. Foram lavadas em tampão Cacodilato, fixadas em solução de Karnovski e desidratadas em solução de etanol para posterior submissão ao ponto crítico e metalização e análise em MEV.

As imagens 1, 2, 3 e 4 (Figura 11) indicam o controle negativo (células que receberam apenas meio DMEM) e evidenciam um padrão morfológico e ultra estrutural de células endoteliais humanas (EAhy926), indicando confluência (). É possível observar nas imagens de maior magnitude (2, 3 e 4), poucas células arredondadas () e produtos semelhantes a debris celulares no cultivo (). Evidencia-se também contato íntimo intercelular () , o que indica boa adesão e integridade celular. As imagens 5, 6, 7 e 8 (células tratadas com DMSO 4%) indicam uma população celular subconfluente com nítidas alterações morfológicas, perdendo o padrão de célula de endotelial. Apresentam alterações e rompimentos membranares () , o que pode ser correlacionado com a presença exacerbada de debris no corpo celular e no substrato. É possível perceber um espaçamento maior entre as células () , possivelmente devido a perda de adesão intercelular. O DMSO, por ser um composto altamente tóxico para as células, induziu danos morfológicos e ultra estruturais, caracterizando células inviáveis.




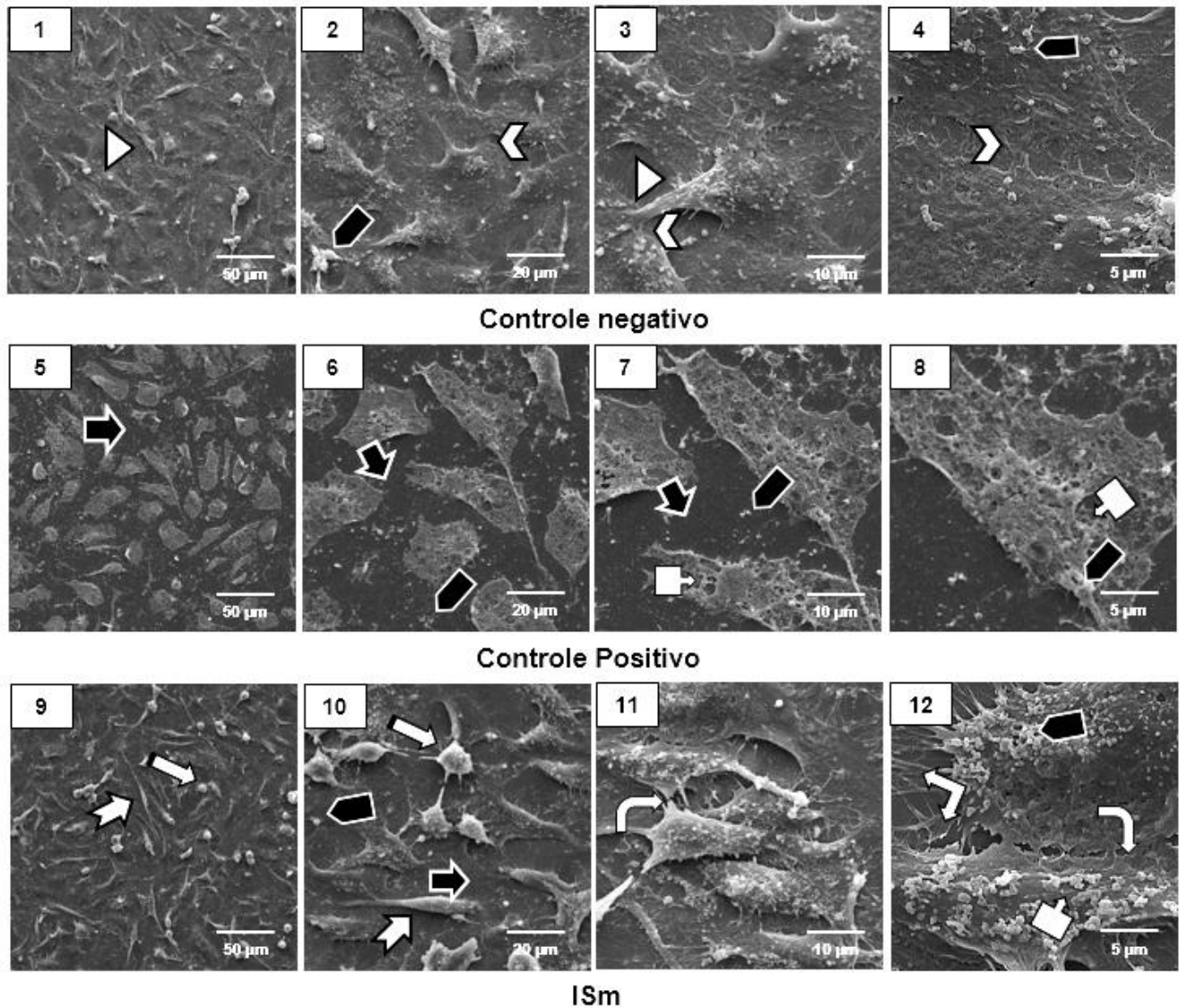
As imagens 9, 10, 11 e 12 indicam células expostas ao ISm. Na imagem panorâmica, fica evidente uma quantia reduzida de áreas de confluência. É possível observar alterações morfológicas das células, de maneira que elas apresentam-se mais alongadas, distanciando-se e com expansões afiladas do corpo celular (). Fica evidente, também, uma menor adesão ao substrato () e menor espraçamento celular. Além disso, há grande presença de células arredondadas, o que condiz com o processo de perda de confluência celular. Um terceiro padrão morfológico de células aderidas, espraçadas, mantendo adesão intercelular semelhante ao padrão descrito para células controle também pode ser observado, entretanto, em número bem reduzido. Nas imagens de maior magnificação (10, 11 e 12), nota-se expressiva presença de prolongamentos membranares de percepção (filopódios) () assim como aumento na produção de material particulado e perfurações na membrana plasmática.

FIGURA 11- ANÁLISE DE ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DAS CÉLULAS EM MEV



FONTE: O Autor (2017)

NOTA: As células receberam meio DMEM (controle negativo), tratamento com DMSO (controle positivo) e com a toxina na contração máxima urêmica (ISm) por 24 horas. Aumentos utilizados: 1.000X, 3.000X, 6.000X e 15.000X.

LEGENDA:

- ▷ Indicativo de confluência celular
- ⇨ Indicativo de presença de células arredondadas
- Indicativo de presença de debris celulares
- Indicativo de contato íntimo de adesão intercelular
- ◻⇨ Indicativo de alterações e rompimentos membranares
- ➡ Indicativo de espaçamento intercelular
- ↪ Indicativo de expansões afiliadas do corpo celular
- ↪ Indicativo de redução de adesão ao substrato
- ↪ Indicativo de presença de filipódios

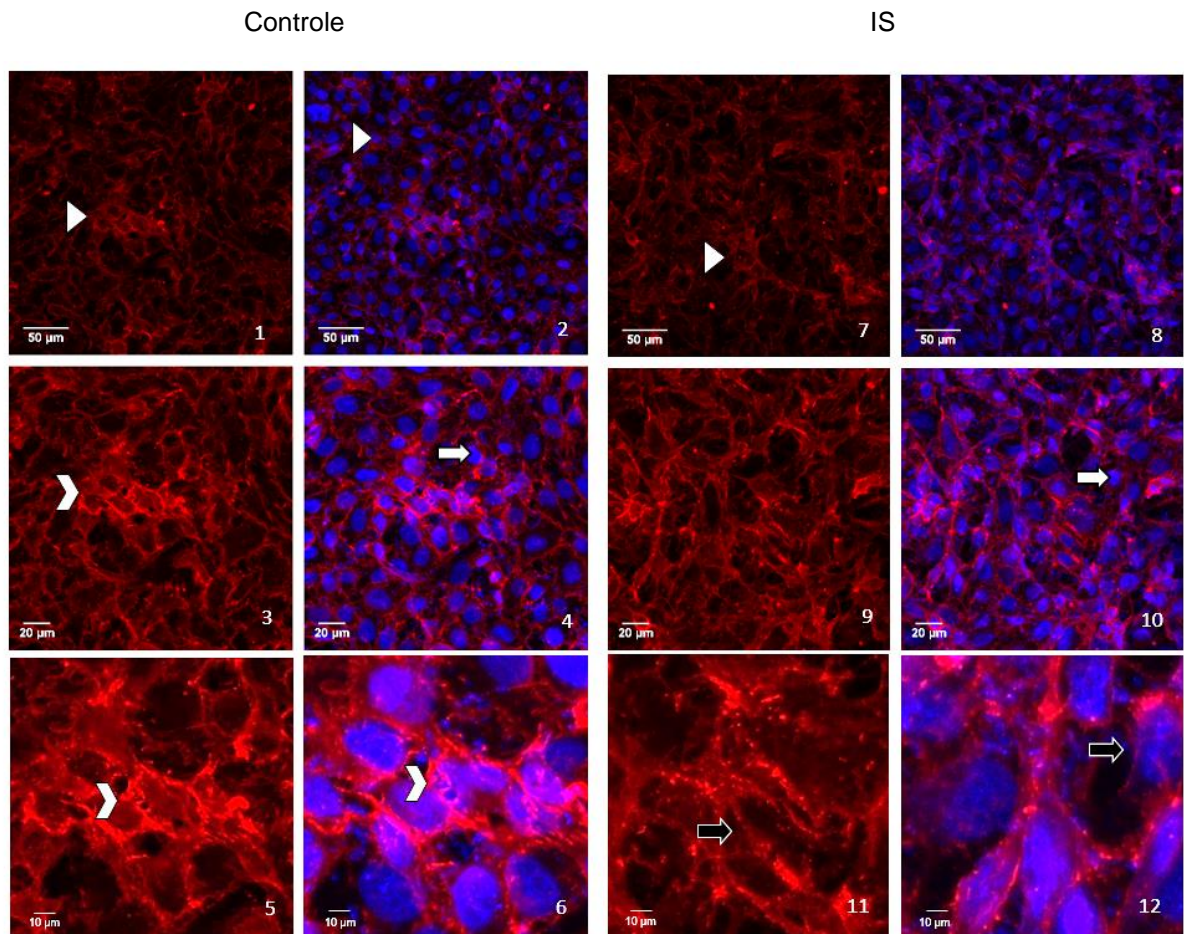
4.4 ANÁLISE DE IMUNOFLUORESCÊNCIA EM LASER CONFOCAL

4.4.1. Análise da marcação de VE-Caderina

Na figura 12, as imagens de 1 a 6 foram obtidas de células controle mantidas somente na presença de meio DMEM por 24 h. Nas imagens panorâmicas (1 e 2), é possível observar que essas células se apresentam em confluência (▷), evidenciando-se marcação positiva para VE-Caderina na totalidade das as células, assim como o núcleo marcado com DAPI (⇒). As imagens de maior magnitude (3, 4, 5 e 6) apresentam células justapostas, existe adesão intercelular onde a marcação para o referido receptor apresenta-se de forma contínua, marcante e expressiva por toda a extensão da membrana celular (⋈).

As imagens de 7 a 12 evidenciam padrão de marcação para VE-caderina em células expostas ao tratamento com o IS na concentração máxima urêmica na mesma cinética. É possível evidenciar o núcleo marcado com DAPI, bem como uma marcação positiva para a VE-caderina (imagens 7 e 8), semelhante ao observado no controle. Entretanto, as imagens de maior magnitude (9,10,11 e 12) evidenciam padrão de marcação distinto, com perda do padrão de marcação homogêneo e contínuo por toda a extensão de membrana evidenciado no controle. O padrão de marcação da VE-caderina para essas células apresenta-se pontual, homogêneo e envolve formação de *clusters* (➡), muito distinto do padrão de marcação da célula controle. Dessa forma, é possível concluir que tanto o controle como células tratadas expressam VE-caderina, entretanto em quantidades e padrão de organização distintos.

FIGURA 12- ANÁLISE DA MARCAÇÃO DE VE-CADERINA EM CÉLULAS CONTROLE E EXPOSTAS AO IS






FONTE: O Autor (2017)

NOTA: A primeira prancha (imagens de 1 a 6) evidencia células controle (mantidas somente com meio DMEM). A segunda prancha (imagens de 7 a 12) evidencia células tratadas com IS na concentração máxima urêmica por 24 h. As imagens 1,3,5,7, 8 e 9 representam apenas marcação para a VE-Caderina (vermelho). O núcleo foi corado com DAPI (azul). As imagens na fileira da direita 2,4,6, 8, 10 e 12 representam a fusão da marcação da proteína com o DAPI. Foram utilizados aumentos de 400X (1,2,7 e 8), 600X (3,4,9 e 10) e 1200X (5,6,11 e 12).

LEGENDA:

- ▷ Indentifica células em confluência
- ⇒ Identifica marcação nuclear com DAPI
- ≫ Identifica intensa marcação para VE-Caderina na membrana celular
- ➡ Identifica formação de *clusters* na marcação da proteína

4.4.2. Análise da marcação de ZO-1

Na figura 13, as imagens de 1 a 4 apresentam células controles mantidas somente na presença de meio DMEM por 24 horas. Nas imagens panorâmicas (1 e 2), é possível observar que essas células apresentam-se em confluência () e com algumas regiões de subconfluência (). Fica evidente uma marcação positiva para ZO-1 na totalidade das células e esse padrão encontra-se de forma contínua na célula (), o que pode ser observado nas imagens de maior magnitude (imagens 3 e 4). O padrão de marcação sugere prevalência da ZO-1 na região submembranar.


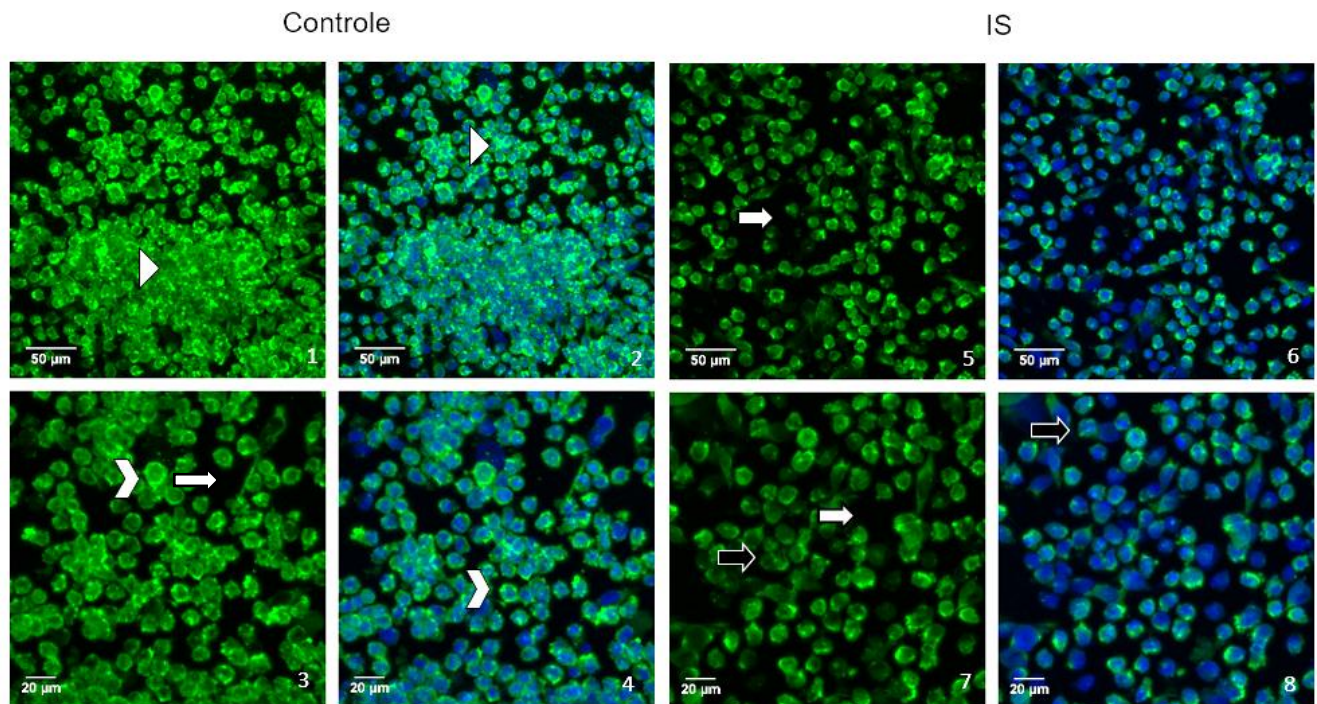
As imagens de 5 a 8 (células expostas ao ISm na cinética de 24 horas) evidenciam padrão de cultivo de células pouco confluentes (indicativo de redução no número de células). Há positividade para marcação de ZO-1, entretanto, em intensidade muito reduzida () quando comparada ao controle, de maneira que o núcleo fica mais evidenciado (azul). Esse resultado é bem evidente quando realizada a comparação das imagens das células tratadas (5 e 7) com células controle (1 e 2). Dessa forma, o IS parece induzir redução na marcação de ZO-1.

FIGURA 13: ANÁLISE DE MARCAÇÃO DE ZO-1 EM CÉLULAS CONTROLES E EXPOSTAS AO IS



FONTE: O Autor (2017)

NOTA: A primeira prancha (imagens de 1 a 4) evidencia células controle (mantidas somente com meio DMEM). A segunda prancha (imagens de 5 a 8) evidencia células tratadas com IS na concentração máxima urêmica por 24 h. As imagens da esquerda (1,3,5 e 7) representam apenas marcação para a ZO-1 (verde), já as imagens na fileira da direita (2,4,6 e 8) consistem na fusão da marcação da proteína com o DAPI (azul). Foram utilizados aumentos de 400X (1,2,5 e 6) e 600X (3,4,7 e 8).

LEGENDA:

- ▷ Identifica células em confluência
- ⇒ Identifica células em subconfluência
- 》 Identifica marcação contínua de ZO -1
- ➡ Identifica redução na marcação de ZO-1

5. DISCUSSÃO

O IS é uma toxina de baixo peso molecular que circula ligada à albumina sérica. Esse composto apresenta-se elevado em pacientes DRC, o que caracteriza um quadro denominado uremia e resulta em efeitos deletérios sobre diferentes tecidos, dentre eles o endotélio vascular. Sabe-se que essa toxina está envolvida com disfunção endotelial e estudos *in vitro* recentes correlacionam o IS com alterações na permeabilidade celular, de modo que na circulação essa toxina pode resultar na ruptura de junções intercelulares e consequente aumento na permeabilidade de células endoteliais pulmonares bovinas (PENG et al., 2012). Dentre as proteínas envolvidas no processo de adesão intercelular estão a VE-caderina, pertencente ao grupo das junções aderentes, e a ZO-1, que é uma proteína de associação às junções de oclusão.

Muitos estudos já demonstraram que o aumento na expressão dessas proteínas no epitélio e endotélio está relacionado com uma barreira celular mais íntegra e que uma redução nessa expressão resulta em aumento na permeabilidade (SHEN et al., 2015), (OHMURA et al., 2017). Entretanto, há pouco na literatura acerca dos efeitos do IS sobre essas proteínas em específico no endotélio vascular, desta forma esse foi o principal objetivo do presente estudo.

Dados da literatura demonstram que a viabilidade endotelial está diretamente relacionada com a integridade do endotélio quando o IS é utilizado na concentração máxima urêmica em células endoteliais humana (TUMUR; NIWA, 2009). Corroborando com estes achados, observamos uma redução significativa na viabilidade celular após o tratamento de 24 e 48 h. Entretanto, após 48 h a viabilidade decaiu em cerca de 25%, ou seja, de maneira muito expressiva, o que poderia prejudicar os ensaios subsequentes, portanto, preconizamos a utilização da cinética de 24 h para o tratamento das células.

Para análise de alterações ultraestruturais nas células após o tratamento com IS, utilizamos a MEV. As imagens demonstraram células fenotipicamente diferentes do controle negativo (sem tratamento), com redução na confluência, aumento no número de células arredondadas, presença de perfurações membranares e um maior distanciamento e espraçamento celular, mais semelhante ao controle positivo (tratamento com DMSO). Esses achados condizem com células submetidas a um estímulo nocivo, nesse caso resultantes da presença da toxina em questão e podem

estar correlacionados com ruptura de contato intercelular e perda de adesão, o que contribuiria para um aumento na permeabilidade endotelial.

Para avaliar alterações na expressão das proteínas VE-Caderina e ZO-1 em nível de transcrição, foi utilizada a técnica de RT-qPCR. Nossos achados demonstraram que o IS reduziu a expressão da VE-caderina com relação ao controle e aumentou a expressão de ZO-1. A redução observada para a VE-caderina confirma nossa hipótese inicial, tendo em vista que esperávamos que a toxicidade do IS reduzisse os contatos intercelulares por meio de alterações em proteínas importantes para esse mecanismo, tais como a caderina em questão. Os resultados para ZO-1, por sua vez, foram surpreendentemente diferentes do que esperávamos, já que um aumento na produção de RNA mensageiro da proteína pode ser correlacionado com uma barreira endotelial mais íntegra e estudos recentes demonstraram uma redução na expressão dessa proteína em situações de ruptura da barreira epitelial (YANG et al., 2017). Hipoteticamente, esse aumento poderia ser indicativo de um mecanismo compensatório da célula, em decorrência da redução na expressão de outras proteínas tais como a VE-caderina ou estar relacionado com alguma particularidade do mecanismo fisiopatológico do IS.

Para visualizar de forma mais clara a presença da VE-caderina e ZO-1 nas células, foi utilizado o ensaio de Imunofluorescência em laser confocal. A marcação para VE-caderina demonstrou pequena alteração na quantidade, mas uma significativa alteração no padrão de marcação após o tratamento de 24 h com IS na concentração máxima urêmica. A toxina induziu um padrão de distribuição mais difuso da VE-caderina, diferente do observado no controle. A expressão da proteína deixou de ser em toda a extensão da membrana e tornou-se homogênea e em *clusters*, ou seja, concentrada em pequenas regiões da célula. Esse achado pode ser indicativo de um processo de internalização da caderina frente ao tratamento, o que explicaria essa alteração no padrão de distribuição evidenciado.

O ensaio de imunofluorescência para marcação da ZO-1, por sua vez, demonstrou uma redução bem evidente na presença dessa proteína nas células após tratamento com IS, quando comparado ao controle. As células sem tratamento apresentaram maior confluência e marcação intensa de ZO-1 na região submembranar na totalidade das células. Já as imagens referentes ao tratamento evidenciaram regiões de menor confluência bem como uma redução expressiva de ZO-1, resultando em uma perda do padrão de marcação submembranar da ZO-1.

Esse achado pode estar relacionado também com internalização para posterior degradação da proteína, por conta do estímulo agressivo da toxina.

Nossos resultados, portanto, demonstraram que o IS possui um efeito tóxico sobre células endoteliais, acarretando alterações na expressão das proteínas VE-caderina e ZO-1. Em nível transcricional foi observado redução na expressão de VE e aumento de ZO-1, o que pode sugerir um processo compensatório da própria célula, tendo em vista que a ZO-1 é associada a outros complexos proteicos, dentre eles com a própria caderina em questão. Já o ensaio de imunofluorescência demonstrou alteração no padrão de distribuição da VE na extensão da membrana celular, mas pouca diferença na quantia da marcação quando comparada ao controle. Observou-se também uma redução expressiva de ZO-1 na maior parte das células.

Dessa forma, as alterações em nível de transcrição das proteínas não se reproduziram na análise por imunofluorescência, principalmente para a ZO-1. Tendo em vista que a qPCR permite quantificação da expressão do promotor e a imunofluorescência realiza marcação da proteína já expressa, esses achados podem sugerir que essas proteínas estão sendo reguladas via modificações pós transcricionais, por meio de RNA's de interferência, fosforilação e ubiquitinação (GAVARD, 2014), o que explicaria as diferenças entre os resultados obtidos. A importância do mecanismo de fosforilação, por exemplo, já foi evidenciada em alguns contextos, dentre eles no desenvolvimento de metástases de câncer de cólon, em que a resistência epitelial apresentou-se reduzida em decorrência da fosforilação e consequente degradação de ZO-1 (KAWAUCHIYA et al., 2011). Estudos recentes também mostraram que o IS, em situações de hipóxia, é capaz de modular alguns fatores importantes nos processos de fosforilação, como o VEGF (HUNG et al., 2016). Assim, pode-se sugerir que o IS esteja alterando a expressão de determinados fatores relacionados com os processos de regulação da VE-caderina e ZO-1, resultando nas alterações encontradas. Dessa forma, é essencial que mais estudos sejam realizados buscando a melhor compreensão dos mecanismos regulatórios dessas proteínas e sua indução na presença do IS, para que nossa hipótese inicial possa ser confirmada.

6.CONCLUSÃO

1. O Indoxil Sulfato na concentração máxima urêmica reduziu a viabilidade de células endoteliais na cinética de 24 e 48 h.
2. O IS induziu alterações morfológicas e estruturais nas células, acarretando perda do padrão estrutural de células endoteliais.
3. O IS reduz significativamente a expressão em nível de transcrição da proteína VE-caderina e aumenta significativamente a expressão de ZO-1.
4. O IS altera o padrão de marcação das proteínas VE-Caderina e ZO-1 em células endoteliais.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente projeto avaliou alterações morfológicas em células de linhagem endotelial vascular imortalizada (EA.hy926) e, também, alterações na marcação e expressão em nível transcricional das proteínas VE-caderina e ZO-1 após tratamento com a toxina IS por 24 horas. Conforme abordado na discussão, as análises do efeito tóxico do composto foram realizadas apenas em nível de transcrição e visualizadas em leitura por imunofluorescência em laser confocal, de maneira que obtivemos resultados interessantes, mas que necessitam de mais estudos para serem conclusivos.

Para obter uma análise mais completa de alterações nessas proteínas, faz-se importante realizar mais ensaios de biologia molecular, como o Western Blotting, para quantificar as proteínas de interesse que estão, de fato, sendo expressas assim como investigar mecanismos de regulação pós transcricionais. Seria interessante realizar a marcação de VE-Caderina e ZO-1 na forma fosforilada e marcadas para degradação por ubiquitinas, por exemplo. Além disso, um próximo passo seria a realização de citometria de fluxo para quantificar a marcação dessas proteínas evidenciadas na imunofluorescência. Com essas investigações, seria possível a obtenção de resultados mais completos que poderiam, então, ser correlacionados com alterações na permeabilidade endotelial.

REFERÊNCIAS

- ANTONETTI, D. A. et al. Vascular endothelial growth factor induces rapid phosphorylation of tight junction proteins occludin and zonula occluden 1. A potential mechanism for vascular permeability in diabetic retinopathy and tumors. **J.Biol.Chem.**, v. 274, n. 33, p. 23463–23467, 1999.
- BALDA, M. S.; ANDERSON, J. M.; MATTER, K. The SH3 domain of the tight junction protein ZO-1 binds to a serine protein kinase that phosphorylates a region C-terminal to this domain. **FEBS Letters**, v. 399, n. 3, p. 326–332, 1996.
- BALDA, M. S.; MATTER, K. The tight junction protein ZO-1 and an interacting transcription factor regulate ErbB-2 expression. **The EMBO journal**, v. 19, n. 9, p. 2024–33, 2000.
- BALDA; MATTER, K. Tight junctions. **Journal of cell science**, v. 111 (Pt 5, p. 541–547, 1998.
- BARRETO, F. C. et al. The quest for a better understanding of chronic kidney disease complications: an update on uremic toxins. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 36, n. 2, p. 221–235, 2014.
- BAZZONI, G. Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 3, p. 869–901, 2004.
- BROMAN, M. T. et al. Cdc42 regulates adherens junction stability and endothelial permeability by inducing α -catenin interaction with the vascular endothelial cadherin complex. **Circulation Research**, v. 98, n. 1, p. 73–80, 2006.
- BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: Minimum Information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, 2009.
- CAI, H. et al. Roundabout 4 Regulates Blood-Tumor Barrier Permeability Through the Modulation of ZO-1, Occludin, and Claudin-5 Expression. **Journal of neuropathology and experimental neurology**, v. 74, n. 1, p. 25–37, 2015.
- CAI, H.; HARRISON, D. G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840–844, 2000.
- CARMELET, P. et al. Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. **Cell**, v. 98, n. 2, p. 147–157, 1999.
- CEREIJIDO, M.; SHOSHANI, L.; CONTRERAS, R. G. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions. I. Biogenesis of tight junctions and epithelial polarity. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 279, n. 3, p. G477-82, 2000.
- CHENG, J. C.; CHANG, H. M.; LEUNG, P. C. K. Transforming growth factor- β 1 inhibits trophoblast cell invasion by inducing snail-mediated down-regulation of vascular endothelial-cadherin protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 46, p. 33181–33192, 2013.
- DEJANA, E.; ORSENIGO, F.; LAMPUGNANI, M. G. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. 2008.
- DEO, R. et al. Kidney dysfunction and fatal cardiovascular disease; an association independent of atherosclerotic events: Results from the Health, Aging, and Body Composition (Health ABC) study. **American Heart Journal**, v. 155, n. 1, p. 62–68, 25 nov. 2008.
- EL NAHAS, M. **Cardio-Kidney-Damage: a unifying concept**. *Kidney international. Anais...*2010

- GANGARAJU VAMSI K. LIN HAIFAN. NIH Public Access. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, v. 10 (2), n. 1, p. 116–125, 2009.
- GAVARD, J. Endothelial permeability and VE-cadherin A wacky comradeship. v. 8, n. 2, p. 158–164, 2014.
- GAVARD, J.; GUTKIND, J. S. VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the β -arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. **Nature Cell Biology**, v. 8, n. 11, p. 1223–1234, 2006.
- GAVARD, J.; GUTKIND, J. S. VE-cadherin and claudin-5 : it takes two to tango. v. 10, n. 8, p. 883–885, 2008.
- GONZALEZ-MARISCAL, L. et al. Tight junction proteins ZO-1, ZO-2, and occludin along isolated renal tubules. **Kidney International**, v. 57, n. 6, p. 2386–2402, 2000.
- HARHAJ, N. S.; ANTONETTI, D. A. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 36, n. 7, p. 1206–1237, 2004.
- HARPER, S.; TOMSON, C.; BATES, D. **Human uremic plasma increases microvascular permeability to water and proteins in vivo**, 2002.
- HERZOG, C. A. et al. Cardiovascular disease in chronic kidney disease. A clinical update from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). **Kidney international**, v. 80, n. 6, p. 572–586, 2011.
- HEUPEL, W.-M. et al. Endothelial barrier stabilization by a cyclic tandem peptide targeting VE-cadherin transinteraction in vitro and in vivo. **Journal of Cell Science**, v. 122, p. 1616–1625, 2009.
- HIRASE, T. et al. Regulation of Tight Junction Permeability and Occludin Phosphorylation by RhoA-p160ROCK-dependent and -independent Mechanisms. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 13, p. 10423–10431, 2001.
- HUGGETT, J. F. et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 892–902, 2013.
- HUNG, S. C. et al. Indoxyl sulfate suppresses endothelial progenitor cell-mediated neovascularization. **Kidney International**, v. 89, n. 3, p. 574–585, 2016.
- INKER, L. A. et al. **KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD** *American Journal of Kidney Diseases*, 2014.
- KAWAUCHIYA, T. et al. Correlation between the destruction of tight junction by patulin treatment and increase of phosphorylation of ZO-1 in Caco-2 human colon cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 2, p. 196–202, 2011.
- LAMBENG, N. et al. Vascular endothelial-cadherin tyrosine phosphorylation in angiogenic and quiescent adult tissues. **Circulation Research**, v. 96, n. 3, p. 384–391, 2005.
- LEE, W. et al. Dysfunction , and Impaired Biogenesis Are Partly Protected by Vitamin C and N-Acetylcysteine. v. 2015, 2015.
- LUSIS, A. J. Atherosclerosis. **Nature**, v. 407, n. 6801, p. 233–41, 2000.
- MACIEL, R. A. P. et al. p-cresol but not p-cresyl sulfate stimulate MCP-1 production via NF- κ B p65 in human vascular smooth muscle cells. **Jornal brasileiro de nefrologia : 'orgão oficial de Sociedades Brasileira e Latino-Americana de Nefrologia**, v. 38, n. 2, p. 153–60, 2016.
- MOE, S. M.; DRUEKE, T. B.; GROUP, FOR THE K. W. KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention and treatment of chronic kidney disease mineral and bone disorder (CKD-MBD). **Kidney Int**, v. 76, n. Suppl 113, p. S1–S128, 2017.

- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.
- NAWROTH, R. et al. VE-PTP and VE-cadherin ectodomains interact to facilitate regulation of phosphorylation and cell contacts. **EMBO Journal**, v. 21, n. 18, p. 4885–4895, 2002.
- NIWA, T. Uremic toxicity of indoxyl sulfate. **Nagoya journal of medical science**, v. 72, p. 1–11, 2010.
- OHMURA, T. et al. Regulation of lung endothelial permeability and inflammatory responses by prostaglandin A2: role of EP4 receptor. **Molecular Biology of the Cell**, v. 28, n. 12, p. 1622–1635, 2017.
- PENG, Y. SEN et al. Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 3, p. 1034–1043, 2012.
- PRANDINI, M.-H. et al. The human VE-cadherin promoter is subjected to organ-specific regulation and is activated in tumour angiogenesis. **Oncogene**, v. 24, n. 18, p. 2992–3001, 2005.
- RUAN, Y. C. et al. CFTR interacts with ZO-1 to regulate tight junction assembly and epithelial differentiation through the ZONAB pathway. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 20, p. 4396–4408, 2014.
- SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Census 2014. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 38, n. 1, p. 54–61, 2016.
- SESSO, R. C. et al. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 39, n. 3, p. 261–266, 2017.
- SHEN, B. et al. A CD52 antibody impairs mouse-transplanted intestinal tight junctions. **Journal of Surgical Research**, v. 196, n. 2, p. 278–284, 2015.
- SHIMIZU, H. et al. Indoxyl sulfate upregulates renal expression of ICAM-1 via production of ROS and activation of NF- κ B and p53 in proximal tubular cells. **Life Sciences**, v. 92, n. 2, p. 143–148, 2013.
- STEWART, C. E. et al. Evaluation of Differentiated Human Bronchial Epithelial Cell Culture Systems for Asthma Research. **Journal of Allergy**, v. 2012, n. di, p. 1–11, 2012.
- STINGHEN, A. E. M. et al. Increased plasma and endothelial cell expression of chemokines and adhesion molecules in chronic kidney disease. **Nephron - Clinical Practice**, v. 111, 2009.
- SULIMAN, M. E. et al. Soluble adhesion molecules in end-stage renal disease: A predictor of outcome. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 21, n. 6, p. 1603–1610, 2006.
- TADDEI, A. et al. Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5. **Nature Cell Biology**, v. 10, n. 8, p. 923–934, 2008.
- TORNAVACA, O. et al. ZO-1 controls endothelial adherens junctions, cell-cell tension, angiogenesis, and barrier formation. **Journal of Cell Biology**, v. 208, n. 6, p. 821–838, 2015.
- TUMUR, Z.; NIWA, T. Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells. **American Journal of Nephrology**, v. 29, n. 6, p. 551–557, 2009.
- UMEDA, K. et al. Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 43, p. 44785–44794, 2004.

- VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, p. 1934–1943, 2003a.
- VANHOLDER, R. et al. Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability. **Kidney International**, v. 63, n. 5, p. 1934–1943, 2003b.
- VANHOLDER, R. et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 20, n. 6, p. 1048–56, jun. 2005.
- VESTWEBER, D. VE-cadherin: The major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 28, n. 2, p. 223–232, 2008.
- VITTET, D. et al. Targeted null-mutation in the vascular endothelial-cadherin gene impairs the organization of vascular-like structures in embryoid bodies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 12, p. 6273–6278, 1997.
- WALLEZ, Y.; HUBER, P. Endothelial adherens and tight junctions in vascular homeostasis, inflammation and angiogenesis. v. 1778, p. 794–809, 2008.
- WEIS, S. et al. Endothelial barrier disruption by VEGF-mediated Src activity potentiates tumor cell extravasation and metastasis. **Journal of Cell Biology**, v. 167, n. 2, p. 223–229, 2004.
- WILLOTT, E. et al. Localization and differential expression of two isoforms of the tight junction protein ZO-1. **Am J Physiol**, v. 262, n. 5 Pt 1, p. C1119-24, 1992.
- YANG, J. et al. C2-ceramide influences alveolar epithelial barrier function by downregulating Zo-1, occludin and claudin-4 expression. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2017.
- ZHANG, J. et al. Relationship of Cx43 regulation of vascular permeability to osteopontin-tight junction protein pathway after sepsis in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, p. ajpregu.00443.2016, 2017.